

## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP00/5204



REC'D 25 JUL 2000

WIPO PCT

R-2

4/22/02

## Bescheinigung

Die Merck Patent GmbH in Darmstadt/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Vorrichtung zur Probenaufgabe"

am 16. Juni 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol G 01 N 27/416 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 23. Dezember 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

*Weller*

chen: 199 27 534.3

*Weinzier*

**PRIORITY DOCUMENT**  
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
 COMPLIANCE WITH  
 RULE 17.1(a) OR (b)

1999

rr99121

1/16

**Merck Patent Gesellschaft  
mit beschränkter Haftung  
64271 Darmstadt**

## **Vorrichtung zur Probenaufgabe**

### Vorrichtung zur Probenaufgabe

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Probenaufgabe für planare, miniaturisierte Analysensysteme.

5

In Bereichen wie der Lebensmittelanalytik, Umweltanalytik oder auch der industriellen Qualitätskontrolle besteht zunehmend Bedarf an Analysensystemen, die schnell und ohne großen apparativen Aufwand die genaue und quantitative Analyse komplexer Gemische ermöglichen. Neben

10

Sensoren oder Schnelltests, die auf spezifischen chemischen Reaktionen basieren und daher keine universellen Verfahren darstellen, werden hauptsächlich chromatographische und elektrophoretische Trennverfahren eingesetzt. Im Gegensatz zu den meisten chromatographischen und elektrophoretischen Verfahren bietet die Isotachophorese (ITP) die

15

Möglichkeit, große Probenmengen bei hoher Trennselektivität ohne vorherige Aufarbeitung zu analysieren. Elektrophoretische Trennverfahren wie die ITP eignen sich zudem auch zum Einsatz in miniaturisierten Analysensystemen (MAS), so daß der apparative Aufwand für die Analysen stark reduziert werden kann. Ein wesentlicher Vorteil des Einsatzes von

20

MAS besteht darin, daß diese nach einer Kontaminierung zu verwerfen. Um diesen Vorteil zu realisieren, muß die Reproduzierbarkeit von Analysen in der Serie und zwischen verschiedenen MAS gleichen Types sichergestellt sein.

25

Neben der Analysenvorrichtung selbst ist einer der wichtigsten Bestandteile eines miniaturisierten Systems die Vorrichtung zur Probenaufgabe. Da Verfahren wie beispielsweise die ITP bezüglich der Beschaffenheit und der Menge der Probe sehr variabel sind, wird durch die Art der Probenaufgabe bestimmt, welches Probenvolumen und welche Art von Probe analysiert

30

werden kann.

In makroskopischen Analysensystemen können ähnlich wie bei Geräten für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie oder Geräten für die Isotachophorese mechanische Aufgabevorrichtungen zur Aufgabe eines definierten Probenvolumens verwendet werden. In Abbildung 3 wird beispielhaft eine  
5 derartige Aufgabevorrichtung aus dem Stand der Technik näher beschrieben. Die Vorrichtungen bestehen zumeist aus komplex aufgebauten Hahn-  
systemen, teilweise mit integrierten Aufgabeschleifen. Auf miniaturisierte  
Analysensysteme lassen sich diese Vorrichtungen nicht übertragen, da  
drehbare Hähne oder sonstige mechanische Vorrichtungen, wie beispiels-  
10 weise verschließbare Ventile, nicht entsprechend miniaturisiert werden  
können.

Deswegen finden sich bei miniaturisierten Analysenvorrichtungen auf Basis von Kapillarelektrophorese (CE) oder ITP Vorrichtungen, bei denen die  
15 Probenaufgabe elektrokinetisch unter Ausnutzung des elektroosmotischen Flusses erfolgt. Dies wird im folgenden elektroosmotische Probenaufgabe genannt. Ein schematischer Aufbau einer solchen Vorrichtung aus dem Stand der Technik ist in Abbildung 2 gezeigt. Durch gekreuzte oder versetzt  
gekreuzte Kapillarstrukturen wird ein Probenvolumen dadurch definiert, daß  
20 zunächst ein Kanal mit Probe gefüllt wird. Dies kann beispielsweise elektroosmotisch durch Anlegen einer Spannung erfolgen. Anschließend werden die Elektroden an dem gefüllten Kanal auf gleiches Potential geschaltet und eine Spannung an dem senkrecht dazu liegenden Trennkanaalsystem angelegt. Auf diese Weise wird das Probenvolumen, das sich an der  
25 Schnittstelle der beiden Kanalsysteme befindet, in das Trennkanaalsystem transportiert. Das so erzeugte Probenvolumen liegt im Bereich einiger Nanoliter oder weniger.

Auf diese Weise ist es zwar möglich, ein durch die Schnittstelle der Kanäle  
30 definiertes Probenvolumen aufzugeben, aber die Volumenelemente, in denen durch Diffusion Stoffaustausch mit den Seitenkanälen stattfindet, sind bezogen auf das durch das Schnittvolumen vorgegebene Proben-

volumen sehr groß. Somit ist das tatsächlich eingebrachte Probenvolumen starken Schwankungen unterworfen. Da nur sehr kleine Probenmengen untersucht werden können, sinkt zudem die Konzentration bestimmter Analyte im Detektionsbereich schnell unter die Nachweisgrenze oder das entnommene Probenvolumen kann nicht als repräsentativ für die Proben-  
5 gesamtheit angesehen werden.

Weiterhin kann die Probenaufgabe bei ausreichend großem Kanalquer-  
10 schnitt durch hydrodynamische Injektion aus einem Probengefäß erfolgen.

Dabei wird ein Teil der Probe durch zeitlich gesteuertes Anlegen eines Druckunterschiedes aus dem externen Probengefäß an den Anfang der Trennkapillare transportiert. Nachteil dieser Technik ist eine starke Abhängigkeit des Probenvolumens von der Beschaffenheit der Probe (z.B.  
15 Viskosität), aber auch von der erreichbaren Genauigkeit der Drucksteuerung. Schon dadurch ist die Aufgabe eines exakt definiertes Probenvolumen nicht möglich. Zusätzlich bestehen auch hier Probleme durch diffusiven bzw. konvektiven Stoffaustausch an den Grenzflächen zwischen Probevolumen und angrenzenden Volumeneinheiten. Bei kommerziellen, nicht miniaturisierten Systemen ist die hydrodynamische  
20 Injektion Stand der Technik, für miniaturisierte Systeme bietet sie keine Vorteile gegenüber der oben beschriebenen elektrokinetischen Injektion unter Ausnutzung des elektroosmotischen Flusses.

Eine direkte, elektrophoretische Injektion aus einem externen Probengefäß  
25 (ohne Ausnutzung des elektroosmotischen Flusses), wie sie ebenfalls in kommerziellen Geräten eingesetzt wird, ist schon vom Prinzip her nicht geeignet, definierte Volumina aufzugeben, da hierbei in der Probelösung kein Volumenfluß erzeugt wird, sondern nur Ionen elektrophoretisch in das Trennsystem überführt werden.

30 Ein weiterer grundsätzlicher Nachteil aller elektroosmotischen Verfahren ergibt sich aus der eingeschränkten Materialauswahl. Da der Proben-

transport an das Auftreten eines elektroosmotischen Flusses gebunden ist, muß eine hohe Ladungsdichte an der Materialoberfläche vorhanden sein. Zudem erfolgt schon während der Aufgabe eine elektrophoretische Auftrennung der Probe, so daß ein inhomogenes Injektionsprofil entsteht.

5

Da mittels ITP problemlos größere Probenvolumina analysiert werden können, wird die Analyseleistung der derzeitigen miniaturisierten Analysensysteme größtenteils durch die ungenügende Möglichkeit zur Aufgabe großer, definierter Probenvolumina eingeschränkt.

10

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, eine Vorrichtung zur Probenaufgabe zu entwickeln, die es ermöglicht, definierte variable Probenvolumina zwischen 0,1 bis 100 µl in ein miniaturisiertes Analysensystem einzubringen.

15

Es wurde gefunden, daß eine Aufgabevorrichtung bestehend aus einem Kanalsystem sowie Fluidikanschlüssen zum Flüssigkeitstransport die Aufgabe großer Probenvolumina in planaren Systemen ermöglicht. Durch Öffnen des Systems am Ende eines Kanalabschnitts und gleichzeitiges

20

Befüllen des Kanalabschnitts mit der Probenlösung am anderen Ende wird ein bestimmter Kanalabschnitt mit der Probenlösung gefüllt. Das Volumen des Kanalabschnitts und somit das aufgegebene Probenvolumen ist durch die Geometrie des Kanalabschnitts bestimmt, ansonsten aber frei wählbar.

25

Gegenstand der Erfindung ist daher eine Vorrichtung zur Aufgabe definierter Probenvolumina über 0,01 µl für miniaturisierte Analysensysteme, umfassend in der Hauptsache mindestens einen Kanalabschnitt, an dessen Enden jeweils Fluidikanschlüsse vorhanden sind.

30

In einer bevorzugten Ausführungsform der Vorrichtung können Probenvolumina zwischen 0,05 und 30 µl aufgegeben werden.

- Bevorzugte Ausführungsform ist weiterhin eine Aufgabevorrichtung, die mindestens zwei hintereinanderliegende Kanalabschnitte enthält, die jeweils von Fluidikanschlüssen begrenzt werden. Wenn beide Kanalabschnitte direkt aneinander grenzen, so sind insgesamt drei Fluidikanschlüsse vorgesehen.
- Bevorzugte Ausführungsform ist auch eine Aufgabevorrichtung, die ein Kanalsystem mit mindestens zwei parallelen Kanalabschnitten enthält, die unabhängig voneinander von Fluidikanschlüssen begrenzt werden.
- Eine bevorzugte Ausführungsform ist eine Vorrichtung, die als Fluidikanschlüsse Ventile und Mikropumpen oder dichtschließende Mikropumpen besitzt.
- Abbildung 1 zeigt eine erfindungsgemäße Aufgabevorrichtung.
- Abbildung 2 zeigt eine Aufgabevorrichtung für miniaturisierte Analysensysteme aus dem Stand der Technik.
- Abbildung 3 zeigt eine Aufgabevorrichtung für makroskopische Analysensysteme aus dem Stand der Technik.
- Im Gegensatz zu anderen Aufgabemethoden wird bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung das Kanalsystem während der Probenaufgabe an zwei Stellen geöffnet. Eine Öffnung dient zur Einleitung der Flüssigkeit, d.h. beispielsweise der Probenlösung, die andere Öffnung ermöglicht den Austritt der vorher im System befindlichen Flüssigkeit oder Luft. Prinzip der erfindungsgemäßen Aufgabevorrichtung ist demnach das Verdrängen eines in einem bestimmten Kanalabschnitt befindlichen Flüssigkeits- oder Gas-Volumens durch die Probenlösung.

Durch geeignete Wahl der Eintritts- und Austrittsöffnung wird lediglich die Flüssigkeit in dem dazwischenliegenden Kanalabschnitt verdrängt bzw. der dazwischenliegende Kanalabschnitt gefüllt. Die Flüssigkeit in eventuell vorhandenen angrenzenden Seitenkanälen wird nicht ausgetauscht, da sich in den Seitenkanälen keine geöffneten Eintritts- oder Austrittsöffnungen befinden und so die Flüssigkeit in diesen Bereichen weder durch Druck noch durch Sog bewegt wird. Verluste bzw. Verdünnungen durch Flüssigkeitsströme an den Kontaktflächen zu Seitenkanälen sind im Verhältnis zum gesamten Probenvolumen, das typischerweise im µl-Bereich liegt, gering. Bei geeigneter konstanter Dosiergeschwindigkeit kann die Probenaufgabe sehr gut reproduzierbar erfolgen. Dies ist ein großer Vorteil gegenüber Methoden, bei denen sehr kleine Probenvolumina von wenigen Nanolitern aufgegeben werden. Eine erfindungsgemäße Aufgabevorrichtung ist prinzipiell auch für Aufgabenvolumina von weniger als 50 nl geeignet. Jedoch sind dann bezüglich Präzision und Genauigkeit Kompromisse notwendig.

Der Transport der Probenflüssigkeit kann über dicht angeschlossene Pumpen, Spritzen, Elektroosmose oder hydrostatischen Druck erfolgen, bevorzugt über Mikropumpen- und Ventile.

Diese Vorrichtungen können bevorzugt außerhalb, möglichst dicht am Chip, angebracht werden.

Die austretende Flüssigkeit muß nicht zusätzlich abgepumpt werden. Sie wird durch den Druck der injizierten Ersatzflüssigkeit hinreichend effektiv verdrängt.

Durch diese Art des Befüllens werden die Nachteile der elektroosmotischen Injektion vermieden, d.h. die Befüllung ist weitgehend unabhängig von Probenzusammensetzung, pH-Wert und dem Material des Analysensystems. Durch die vorhandenen Ventile oder dichtschließenden Pumpen

wird jede störende Flüssigkeitsbewegung, wie beispielsweise durch hydrostatische Druckdifferenzen oder Elektroosmose, unterbunden.

- 5 Erfindungsgemäß werden alle Ventile, Pumpen bzw. Mikropumpen, dichtschließende Mikropumpen oder sonstigen Anschlüsse der erfindungsgemäßen Vorrichtung, die zum Befüllen des Kanalsystems dienen, als Fluidikanschlüsse bezeichnet.
- 10 Die erfindungsgemäße Aufgabevorrichtung kann für jede Art von planarem miniaturisiertem Analysensystem eingesetzt werden. Es kann sich dabei um Systeme für die Analytik handeln oder auch um Systeme, die zusätzlich Trenn- oder Derivatisierungseinheiten enthalten. Dem Fachmann sind entsprechende miniaturisierte Systeme bekannt.
- 15 Viskosität und Ionenstärke der Probenlösung oder der zu verdrängenden Lösung, d.h. z.B. eines Transportpuffers, haben nur geringen Einfluß auf die Dosierung oder die Einfüllgeschwindigkeit. Es ist möglich, Suspensionen, Emulsionen, partikel- und zellhaltige Flüssigkeiten einzufüllen. Genauso unterliegt die Wahl des Materials zum Aufbau der
- 20 Analysenvorrichtung, d.h. besonders die Beschaffenheit der Wände des Kanalsystems der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Probenaufgabe keiner Einschränkung. Auch Druckschwankungen, Pulsationen, Anlauf- oder Stopeffekte während des Einbringens der Probe haben auf die Dosiergenauigkeit keinen Einfluß.
- 25 Weiterhin ist hat erfindungsgemäße Vorrichtung bezüglich des Aufgabe-volumens systembedingt weite Grenzen. Das Volumen der Probe-flüssigkeit, die injiziert werden kann, wird allein durch das Volumen des Kanalabschnitts bestimmt, der sich zwischen den Öffnungen befindet.
- 30 Durch Variation der geometrischen Abmessungen dieses Abschnitts bei dem Design des Kanalsystems der Analysevorrichtung lassen sich vorab an das analytische Problem angepasste Probenvolumina festlegen.

- Genauso ist es möglich, verschieden große Abschnitte parallel und/oder in Reihe zu implementieren, so daß das Volumen des durch die Probenlösung zu verdrängenden Abschnitts variiert werden kann. Bevorzugterweise wird deshalb ein Analysesystem zur Nutzung der erfindungsgemäßen
- 5 Vorrichtung mit mehreren Kanalabschnitten unterschiedlicher Dimension versehen, die über jeweils unabhängige Fluidikanschlüsse für die Probenaufgabe verwendet werden können. Dadurch können Probenvolumina zwischen 0,01 µl und 100 µl, bevorzugt zwischen 0,05 und 30 µl in unterschiedlicher Abstufung je nach Bedarf injiziert werden. Dabei
- 10 werden üblicherweise Variationskoeffizienten bei der Aufgabe von Probenvolumina ab 1 µl von etwa 5%, typischerweise unter 2% erreicht.
- Auf diese Weise können quantitativ reproduzierbare und leicht handhabbare repräsentative Probenmengen eines flüssigen Analyten in jedes
- 15 mikrostrukturierte System eingebracht werden. Besonders bevorzugt ist der Einsatz der erfindungsgemäßen Vorrichtung für die ITP, da damit die Möglichkeit gegeben ist, kleinste Mengen von Analyten aus großen Probenvolumina anzureichern und zu separieren.
- 20 Abbildung 1 zeigt beispielhaft eine mögliche Anordnung des Kanalsystems der erfindungsgemäßen Aufgabevorrichtung. Das Kanalsystem ist in zwei Kanalabschnitte 1A und 1B mit unterschiedlichem Volumen unterteilt. Daran angrenzend befindet sich der Trennkanal 1C. Über die Fluidikanschlüsse 11, 12 und 13 kann entweder der Kanalabschnitt 1A (Bei Öffnen der Anschlüsse 11 und 12) oder der Kanalabschnitt 1B (Bei Befüllen über die Anschlüsse 12 und 13) oder die beiden Kanalabschnitte zusammen (bei Befüllen über die Anschlüsse 11 und 13) mit der Probenlösung gefüllt werden. Nach Befüllen der Aufgabeabschnitte wird durch Anlegen einer Spannung die Probe in Abschnitt 1C aufgetrennt. Falls nur
- 25 Abschnitt 1A mit der Probe gefüllt wurde, kann auch Abschnitt 1B als
- 30

Trennstrecke genutzt werden, so daß die Trennstrecke bei Bedarf verlängert werden kann.

Abbildung 2 zeigt eine Möglichkeit zur elektrokinetischen Probenaufgabe in miniaturisierten Analysensystemen nach dem Stand der Technik. Die Bilder A, B, C und D zeigen die einzelnen Schritte der Probenaufgabe. Bild A zeigt schematisch eine gekreuzte Kanalstruktur. An den Enden der Kanäle befinden sich die Elektroden E1 bis E4. Zunächst wird, wie in Bild B verdeutlicht, durch Anlegen einer Spannung zwischen Elektrode E1 (0 V) und E2 (+ 500 V) ein Kanal mit Probe befüllt. Anschließend werden, wie in Bild C gezeigt, die Elektroden an dem befüllten Kanal auf gleiches Potential geschaltet (z.B. E1 und E2 beide auf + 400 V) und eine Spannung an dem senkrecht dazu liegenden Trennkanalsystem angelegt ( $E_3 = 0 \text{ V}$  und  $E_4 = + 2,5 \text{ kV}$ ). Auf diese Weise wird das Probenvolumen, das sich an der Schnittstelle der beiden Kanalsysteme befindet, in das Trennkanalsystem transportiert (Bild D). Das so erzeugte Probenvolumen liegt im Bereich einiger Nanoliter oder weniger.

Abbildung 3 zeigt eine Möglichkeit zur Probenaufgabe in makroskopischen Analysensystemen, wie beispielsweise dem Isotachophoresegerät ItaChrom® EA 101 der Firma I + M, Analytische Meß- und Regeltechnik, Deutschland. Die Bilder A1/A2, B1/B2 und C1/C2 zeigen die unterschiedlichen Stufen der Probenaufgabe, wobei die Bilder A1, B1 und C1 eine Seitenansicht der Aufgabevorrichtung zeigen, die Bilder A2, B2 und C2 eine Ansicht von oben. Diese mechanische Vorrichtung zur Probenaufgabe besteht aus einem Hahn K, der von einer Ummantelung U umgeben ist. Sowohl die Ummantelung U, wie auch der Hahn K sind mehrfach von Kanälen durchbrochen. Der Hahn K kann in der Ummantelung U derart gedreht werden, daß jeweils bestimmte Kanäle in Hahn und Ummantelung verbunden werden und so Flüssigkeiten aus Vorratsgefäß en durch die gezeigte Vorrichtung definiert in das angeschlossene Isotachophoresegerät gelangen. Vorratsbehälter und das ITP-Gerät sind in der Abbildung nicht

gezeigt, sondern lediglich durch Pfeile angedeutet. In den Abbildungen A1/A2 ist der Hahn derart gedreht, daß eine Verbindung der Kanalstücke 3, 4 und 5, sowie 2 und 6 besteht. Dadurch wird Kanalstück 5 im inneren des Hahns mit Probelösung aus einem Vorratsgefäß gefüllt, das mit Kanal 3 verbunden ist. Außerdem wird über ein Vorratsgefäß an Kanal 2 das Kanalsystem des Isotachophoresegeräts mit einem der beiden für eine ITP notwenigen Trennpuffer (Puffer 1) gefüllt.

In einem zweiten Schritt (Bild B1/B2) wird der Hahn K so gedreht, daß die in Bild A1/A2 bestandenen Kanalverbindungen unterbrochen werden. Statt dessen wird eine Verbindung der Kanalstücke 1 und 7 hergestellt. Auf diese Weise wird das hinter der Aufgabevorrichtung liegende Kanalsystem mit einem zweiten Puffer (Puffer 2) gefüllt. In Bild C1/C2 wird schließlich der Hahn K erneut gedreht, so daß eine Verbindung der Kanalstücke 1, 5 und 2 entsteht. Kanal 2 ist mit Puffer 1 gefüllt, Kanal 5 mit der Probenlösung und Kanal 1 mit Puffer 2. Auf diese Weise ist ein durch die Abmessungen von Kanal 5 definiertes Volumen der Probenlösung zwischen den für die ITP notwendigen zwei Puffern eingebettet. Durch Anlegen einer Spannung kann nun die Trennung begonnen werden.

20

25

Auch ohne weitere Ausführungen wird davon ausgegangen, daß ein Fachmann die obige Beschreibung im weitesten Umfang nutzen kann. Die bevorzugten Ausführungsformen und Beispiele sind deswegen lediglich als beschreibende, keineswegs als in irgendeiner Weise limitierende Offenbarung aufzufassen.

30

Die vollständige Offenbarung aller vor- und nachstehend aufgeführten Anmeldungen, Patente und Veröffentlichungen sind durch Bezugnahme in diese Anmeldung eingeführt.

## Ansprüche

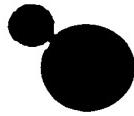
1. Vorrichtung zur Aufgabe definierter Probenvolumina über 0,01 µl für miniaturisierte Analysensysteme umfassend mindestens einen Kanalabschnitt, an dessen Enden jeweils mindestens ein Fluidikanschluß vorhanden ist.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Probenvolumen zwischen 0,05 und 30 µl beträgt.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Kanalsystem mindestens zwei hintereinanderliegende Kanalabschnitte enthält, die jeweils von Fluidikanschlüssen begrenzt werden.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Kanalsystem mindestens zwei parallele Kanalabschnitte enthält, die unabhängig voneinander von Fluidikanschlüssen begrenzt werden.
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Fluidikanschlüsse dichtschließende Mikropumpen dienen.
6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Fluidikanschlüsse Ventile und Mikropumpen dienen.

## **Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Probenaufgabe für miniaturisierte Analysensysteme. Durch gezieltes Design des Kanalsystems und

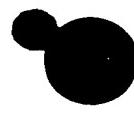
- 5 Verdrängen des Flüssigkeitsvolumens eines bestimmten Kanalabschnitts können definierte Volumina von 0,1 µl bis zu 100 µl aufgegeben werden. Die erfindungsgemäße Vorrichtung eignet sich insbesondere für eine anschließende Analyse der Proben mittels Isotachophorese.

10



15

20

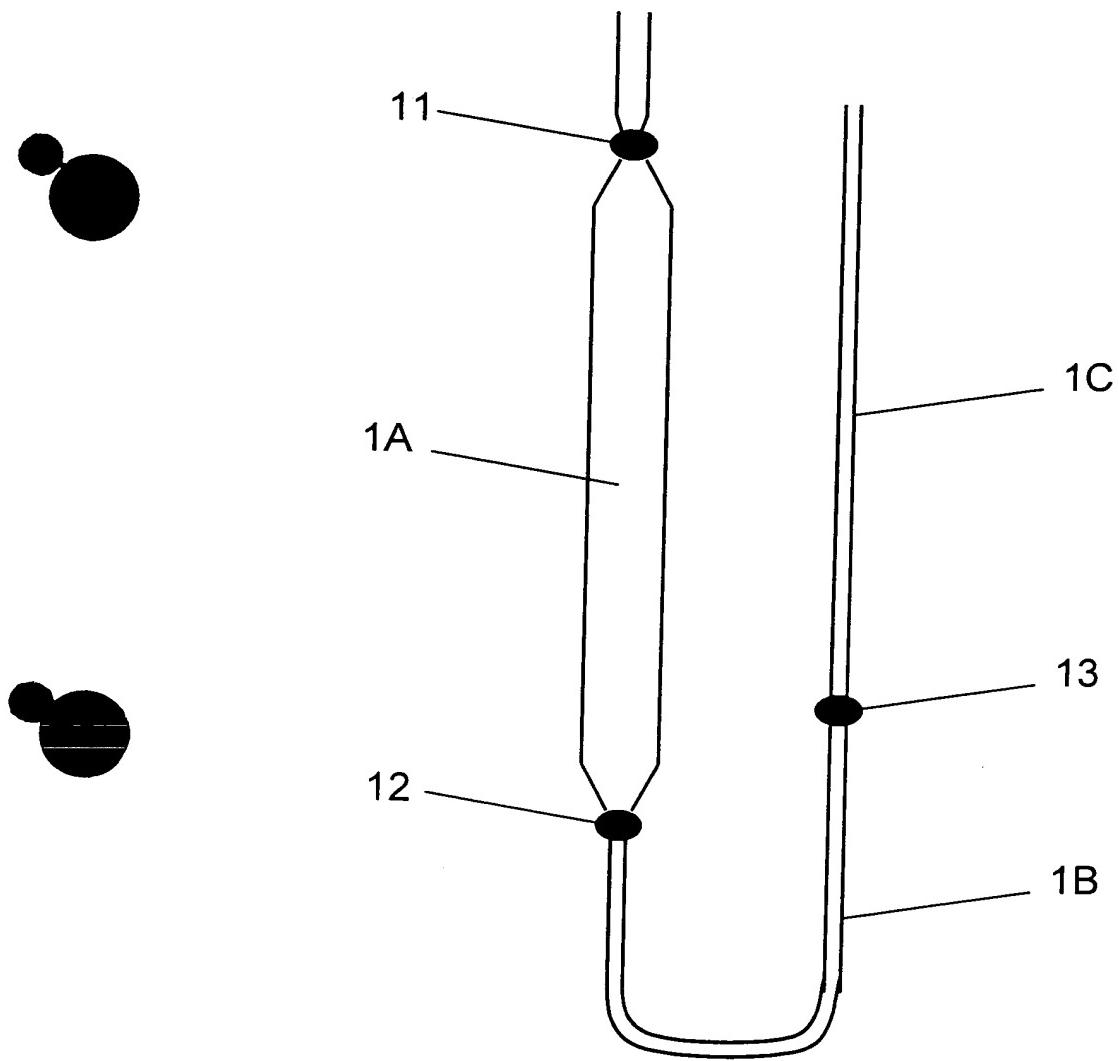


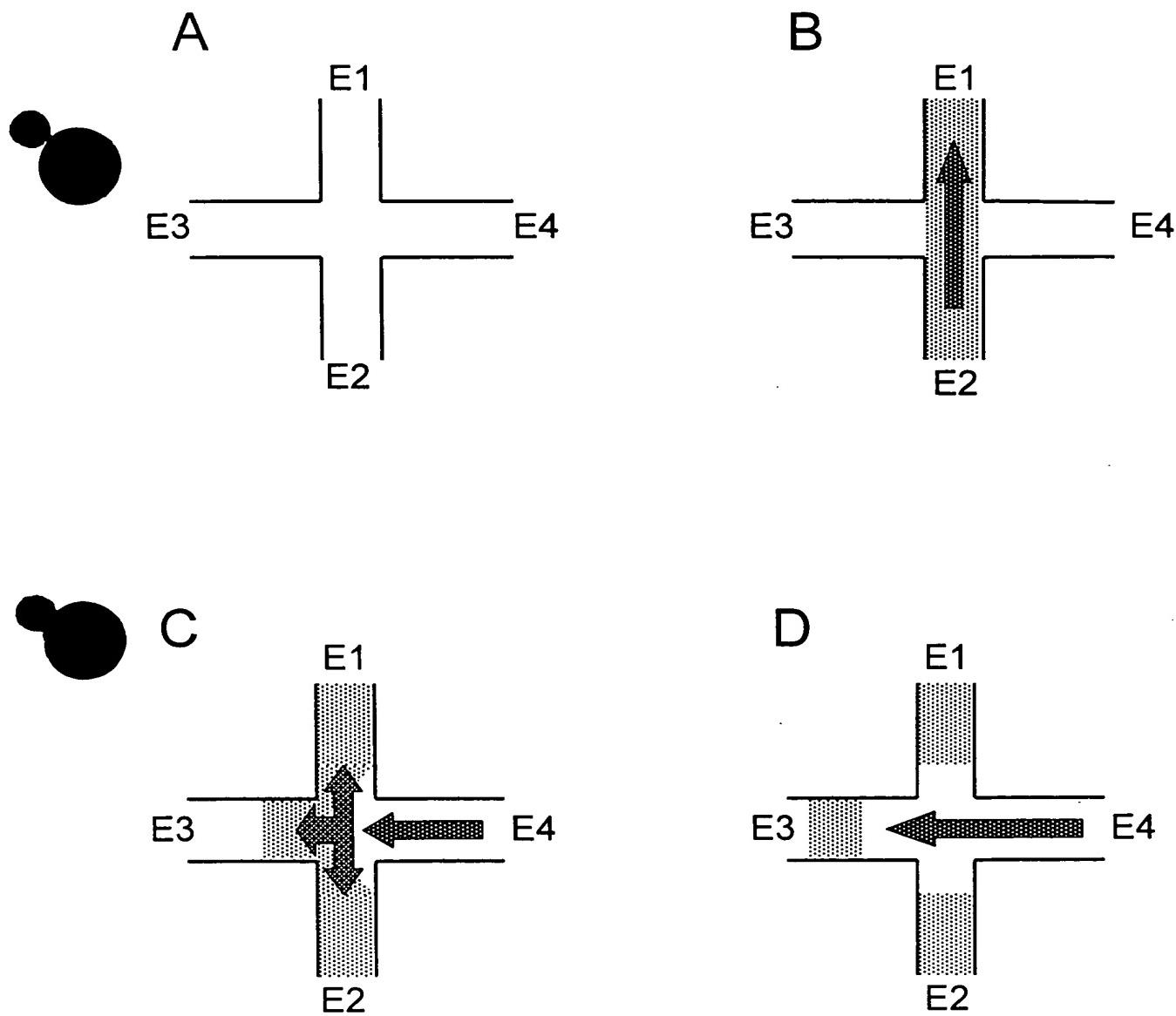
25

30

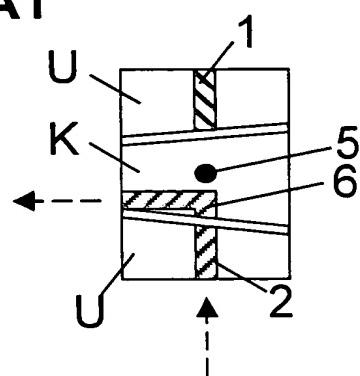
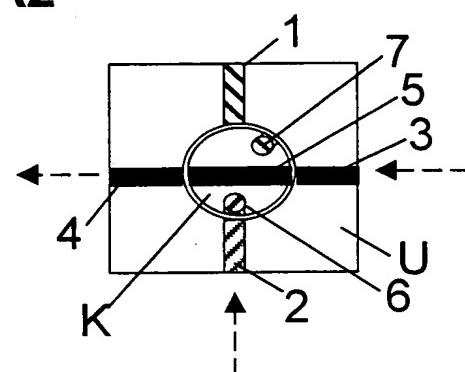
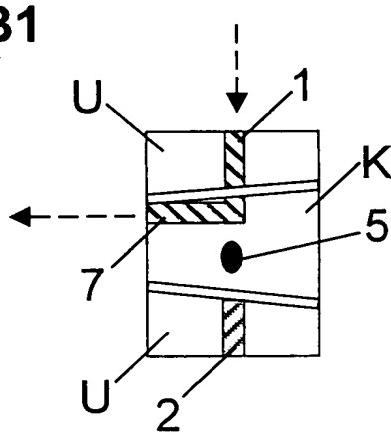
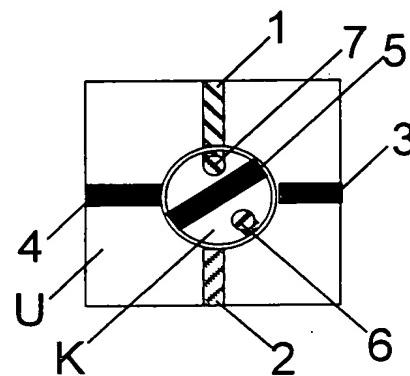
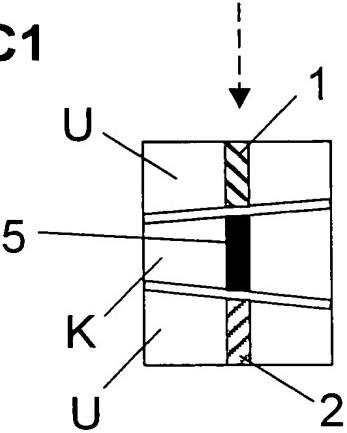
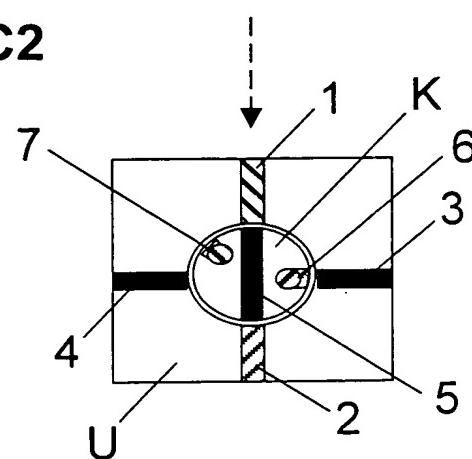
1/3

Fig. 1



**2/3****Fig. 2**

3/3

**Fig. 3****A1****A2****B1****B2****C1****C2**



1